

**POTENSI METABOLIT *RHIZOBACTERIA* SAMBILOTO
(*Andrographis paniculata*) SEBAGAI ANTIBAKTERI
Salmonella Typhi ATCC 58105535**

SKRIPSI

oleh
ARNOLDUS REYNALDO DIPRATAMA
145090107111013



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**POTENSI METABOLIT *RHIZOBACTERIA* SAMBILOTO
(*Andrographis paniculata*) SEBAGAI ANTIBAKTERI
Salmonella Typhi ATCC 58105535**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi**

**oleh
ARNOLDUS REYNALDO DIPRATAMA
145090107111013**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

POTENSI METABOLIT *RHIZOBACTERIA* SAMBILOTO (*Andrographis paniculata*) SEBAGAI ANTIBAKTERI *Salmonella* Typhi ATCC 58105535

ARNOLDUS REYNALDO DIPRATAMA
145090107111013

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada 15 Oktober 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Dr. Suharnong, M.Si.

NIP. 196302231988021001

Mengetahui

Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodiyati Azmaningsih, S.Si., M.Sc., PhD.

NIP. 197001281994122001



HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Arnoldus Reynaldo Dipratama
NIM : 145090107111013
Jurusan : Biologi
Penulis Skripsi berjudul : Potensi Metabolit *Rhizobacteria*
Sambiloto (*Andrographis paniculata*)
sebagai Antibakteri *Salmonella* Typhi
ATCC 58105535

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 24 Oktober 2018
Yang menyatakan



Arnoldus Reynaldo Dipratama
145090107111013

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



Potensi Metabolit *Rhizobacteria* Sambiloto (*Andrographis paniculata*) sebagai Antibakteri *Salmonella* Typhi ATCC 58105535

Arnoldus R. Dipratama, Suharjono
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya
2018

ABSTRAK

Salmonella Typhi merupakan bakteri penyebab demam tifoid yang dapat diobati dengan pemberian antibiotik, namun bakteri tersebut menunjukkan resisten terhadap beberapa antibiotik. Salah satu tanaman obat yang dapat digunakan untuk mengobati demam tifoid adalah *Andrographis paniculata* yang mengandung senyawa antibakteri. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis daya hambat metabolit *rhizobacteria* *A. paniculata* terhadap *S. Typhi* ATCC 58105535 dan mengidentifikasi spesies bakteri unggul. Metode penelitian meliputi isolasi *rhizobacteria* *A. paniculata* menggunakan teknik dilusi, skrining *rhizobacteria* dan uji potensi metabolit bakteri terhadap *S. Typhi* ATCC 58105535 menurut metode *disc diffusion*, dan identifikasi *rhizobacteria* unggul berdasarkan sekuen 16S rDNA. Tanah rizosfer *A. paniculata* terdapat 21 isolat bakteri, dua isolat yaitu SL7 dan SL18 menunjukkan daya hambat tertinggi terhadap *S. typhi* ATCC 58105535 dengan diameter zona hambat secara berurutan adalah $8,31 \pm 2,6$ dan $8,05 \pm 0,58$ mm. Metabolit *cell-free supernatant* (CFS) isolat SL7 lebih unggul menghambat *S. typhi* ATCC 58105535 dengan diameter zona hambat $7,33 \pm 0,08$ mm dibandingkan SL18. Isolat SL7 merupakan *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169 dengan nilai similaritas sekuen 16S rDNA sebesar 100 %. Isolat SL7 dapat dikembangkan sebagai agen penghasil metabolit antibakteri patogen.

Kata kunci: *Andrographis paniculata*, antibiotik, metabolit, rizosfer, *Salmonella* Typhi

repository.ub.ac.id

**The Potency of Rhizobacteria Metabolites of Sambiloto
(*Andrographis paniculata*) as Antibacteria against *Salmonella*
Typhi ATCC 58105535**

Arnoldus R. Dipratama, Suharjono
Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
Brawijaya University
2018

ABSTRACT

Salmonella Typhi causes typhoid fever disease which can be treated by using antibiotics, however *S. typhi* has been resistant to common antibiotics. One of medicinal plants which can be used to treat typhoid fever is *Andrographis paniculata* that contain antibacteria substance. The purposes of this research were to analyze the inhibiting ability of rhizospheric bacteria metabolites of *A. paniculata* against *S. Typhi* ATCC 58105535 and to identify the best bacteria species to inhibit *S. Typhi* ATCC 58105535. The methods were isolation of *A. paniculata*'s rhizobacteria using dilution technique, screening test of rhizobacteria and potency assay of bacterial metabolites against *S. Typhi* ATCC 58105535 using disc diffusion method, and molecular identification of the best rhizobacteria based on 16S rDNA sequence. There were 21 different isolates obtained from rhizosphere of *A. paniculata*. Two isolates were SL7 and SL18 showed the highest activity ($8,31 \pm 2,6$ and $8,05 \pm 0,58$ mm diameter) respectively. The metabolite of cell-free supernatant (CFS) of SL7 had better ability than SL18 to inhibit *S. Typhi* ATCC 58105535, which had $7,33 \pm 0,08$ mm diameter. Isolate of SL7 with *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169 had 100 % of similarity value of 16S rDNA sequence. Isolate SL7 can be developed as antibacterial metabolites producing agent against pathogen.

Keywords: *Andrographis paniculata*, antibiotic, metabolites, rhizosphere, *Salmonella* Typhi

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur dipanjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus yang selalu melimpahkan berkat dan kasih-Nya sehingga skripsi yang berjudul “Potensi Metabolit *Rhizobacteria* Sambiloto (*Andrographis paniculata*) sebagai Antibakteri *Salmonella* Typhi ATCC 58105535” dapat diselesaikan dengan baik. Tujuan dari penyusunan skripsi ini adalah sebagai salah satu syarat kelulusan di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya serta untuk memenuhi syarat memperoleh gelar Sarjana Sains.

Rasa terima kasih yang sedalam-dalamnya disampaikan kepada seluruh pihak yang telah terlibat, yaitu:

1. Bapak Dr. Suharjono, M.Si. sebagai dosen pembimbing yang telah mendidik dan mendorong untuk menjadi lebih baik.
2. Bapak Yoga Dwi Jatmiko, S.Si., M.App.Sc., PhD. dan Bapak Irfan Mustafa, S.Si., M.Si., PhD. sebagai dosen penguji serta seluruh dosen Mikrobiologi dan laboran Laboratorium Mikrobiologi.
3. Orang tua yang selalu memotivasi dan mendukung dalam suka dan duka serta selalu mengasihi.
4. Adik yang senantiasa memberikan semangat tiada henti.
5. Teman-teman yang selalu mendukung penuh dan saling memberi masukan.

Saran dan masukan sangat diharapkan sehingga dapat membuat skripsi ini menjadi lebih baik.

Malang, 16 Oktober 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xiv
 BAB I PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	 3
2.1 <i>Salmonella</i> Typhi dan Demam Tifoid	3
2.2 Patogenesis <i>Salmonella</i> Typhi	4
2.3 Diagnosis Demam Tifoid	6
2.4 Mekanisme Antibiotik dalam Menghambat Pertumbuhan <i>Salmonella</i> Typhi	7
2.5 Resistensi <i>Salmonella</i> Typhi terhadap Antibiotik	9
2.6 <i>Multidrug-Resistant Typhoid Fever</i> (MDRTF)	11
2.7 Sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i>)	12
2.8 Potensi <i>Rhizobacteria</i> sebagai Antibakteri	13
2.9 Senyawa Metabolit Bakteri sebagai Antibiotik	14
 BAB III METODE PENELITIAN	 16
3.1 Waktu dan Tempat	16
3.2 Pengukuran Faktor Lingkungan Tanah	16
3.3 Isolasi <i>Rhizobacteria Andrographis</i> <i>paniculata</i>	17

3.4	Skrining <i>Rhizobacteria Andrographis paniculata</i> sebagai Antibakteri <i>Salmonella</i> Typhi ATCC 58105535	18
3.5	Pembuatan Kurva Standar dan Pertumbuhan Isolat <i>Rhizobacteria</i> Tanaman <i>Andrographis paniculata</i>	19
3.6	Uji Potensi Metabolit <i>Rhizobacteria Andrographis paniculata</i> sebagai Antibakteri <i>Salmonella</i> Typhi ATCC 58105535	20
3.7	Identifikasi <i>Rhizobacteria Andrographis paniculata</i> Berdasarkan Sekuen 16S rDNA ...	21
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		24
4.1	Faktor Lingkungan Tanah Rizosfer <i>Andrographis paniculata</i>	24
4.2	Potensi <i>Rhizobacteria Andrographis paniculata</i> sebagai Antibakteri <i>Salmonella</i> Typhi ATCC 58105535	26
4.3	Potensi Metabolit <i>Rhizobacteria Andrographis paniculata</i> sebagai Antibakteri <i>Salmonella</i> Typhi ATCC 58105535	27
4.4	<i>Rhizobacteria Andrographis paniculata</i> Penghambat <i>S. Typhi</i> ATCC 58105535	31
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		34
5.1	Kesimpulan	34
5.2	Saran	34
DAFTAR PUSTAKA		35
LAMPIRAN		40

DAFTAR TABEL

No.		Halaman
1.	Antibiotik dan mekanisme penghambatan bakteri	9
2.	Komposisi PCR <i>mix</i>	22
3.	Kondisi program PCR sampel	22
4.	Parameter lingkungan tanah rizosfer <i>Andrographis paniculata</i>	24
5.	Nilai pH <i>cell free supernatant</i> isolat SL7 dan SL18 yang tidak diatur	28



DAFTAR GAMBAR

No.		Halaman
1.	Struktur antigenik <i>Salmonella</i> Typhi	3
2.	Infeksi oleh <i>Salmonella</i> Typhi	5
3.	Hasil uji Widal untuk deteksi demam tifoid	7
4.	Mekanisme kerja antibiotik terhadap sel bakteri	8
5.	Mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik	10
6.	Struktur kimia andrographolide	12
7.	Produksi antibiotik penicillin	15
8.	Perbandingan mikroorganisme yang mampu menghasilkan antibiotik	15
9.	Lokasi pengambilan sampel tanah <i>Andrographis paniculata</i> melalui Google Earth	16
10.	Diameter zona hambat <i>rhizobacteria</i> <i>A. paniculata</i> terhadap <i>Salmonella</i> Typhi ATCC 58105535	27
11.	Perbandingan diameter zona hambat CFS <i>rhizobacteria</i> dengan pH diatur (netral) dan tidak diatur terhadap <i>S. Typhi</i> ATCC 58105535	29
12.	Pohon filogeni isolat SL7 bersama isolat-isolat acuan berdasarkan homologi sekuen 16S rDNA dengan algoritma <i>Neighbor-Joining</i>	31

DAFTAR LAMPIRAN

No.		Halaman
1.	Pembuatan gel agarosa untuk elektroforesis	40
2.	Morfologi isolat <i>rhizobacteria</i> <i>A. paniculata</i>	40
3.	Bentuk dan Gram isolat <i>rhizobacteria</i> <i>A. paniculata</i>	41
4.	Diameter zona hambat <i>rhizobacteria</i> <i>A. paniculata</i> terhadap <i>S. Typhi</i> ATCC 58105535	42
5.	Uji normalitas data diameter zona hambat <i>rhizobacteria</i>	43
6.	Analisis ragam diameter zona hambat isolat bakteri dengan <i>post-hoc</i> Tukey	44
7.	Kurva standar isolat <i>rhizobacteria</i>	45
8.	Kurva pertumbuhan isolat <i>rhizobacteria</i>	46
9.	Uji CFS bakteri berdasarkan waktu inkubasi selama fase stasioner	47
10.	Uji normalitas data diameter zona hambat CFS <i>rhizobacteria</i>	48
11.	Analisis ragam diameter zona hambat CFS isolat bakteri dengan <i>post-hoc</i> Tukey	49
12.	Hasil elektroforesis ampikon 16S rDNA isolat SL7 dan SL18	50
13.	Sekuen hasil contig 16S rDNA isolat SL7	51
14.	Elektroferogram 16S rDNA isolat SL7 27f	52
15.	Elektroferogram 16S rDNA isolat SL7 1492r ..	57
16.	<i>Pairwise distance</i> SL7 bersama isolat-isolat acuan dalam pohon filogeni berdasarkan sekuen 16S rDNA	62

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ddH ₂ O	<i>double-distilled water</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
DNA	<i>deoxyribose nucleic acid</i>
EtBr	<i>ethidium bromide</i>
NaCl	<i>sodium chloride</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	<i>potential hydrogen</i>
sp.	<i>spesies</i>
TBE	<i>tris borate EDTA</i>
TPC	<i>total plate count</i>
VOC	<i>volatile organic compound</i>

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Nama unit</u>
bp	<i>base pair</i>
β	<i>beta</i>
C	<i>celcius</i>
δ	<i>delta</i>
g	<i>gram</i>
μL	<i>mikroliter</i>
mL	<i>mililiter</i>
mm	<i>milimeter</i>
nm	<i>nanometer</i>
pmol	<i>pikomol</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salmonella Typhi merupakan bakteri Gram negatif penyebab penyakit demam tifoid. Bakteri ini memiliki tiga antigen utama, yaitu antigen O, antigen H, dan antigen Vi (Ugboko & De, 2014). *World Health Organization* (2015) menyatakan bahwa pada tahun 2014 di seluruh dunia terdapat 21 juta kasus demam tifoid dan menyebabkan kematian 220.000 orang per tahun. Angka penderita demam tifoid di Indonesia pada tahun 2015 mencapai 1,6 % (Tribun Jabar, 2015). Penyakit ini dapat menular dengan mudah melalui air ludah, makanan, dan feses penderita (Pang & Guindon, 2004). Demam tifoid dapat diobati dengan mengonsumsi beberapa kelompok antibiotik, seperti chloramphenicol, macrolides, penicillin, cephalosporin, quinolone, dan sulfonamide. Antibiotik tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri penyebab demam tifoid (Ugboko & De, 2014).

Alternatif lain untuk melawan dan menghambat pertumbuhan bakteri *S. Typhi* perlu diteliti karena bakteri tersebut telah mengalami resistensi terhadap sebagian antibiotik yang telah ada. Tanaman *Andrographis paniculata* merupakan anggota Famili Acanthaceae yang bagian daun serta akarnya biasa dimanfaatkan sebagai obat demam tifoid. Daun dan akarnya berpotensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. Typhi* yang menyebabkan penyakit demam tifoid karena mengandung andrographolide (Jayakumar dkk., 2013). Selain berperan sebagai antibakteri, andrographolide dikenal pula sebagai antiinflamasi dan antivirus (Hossain dkk., 2014).

Sampai saat ini, tanaman *A. paniculata* hanya dimanfaatkan pada bagian tanamannya saja padahal metabolit *rhizobacteria* tanaman tersebut juga dapat digunakan sebagai antibakteri. Seperti yang dijelaskan oleh Mendes dkk. (2013) bahwa *rhizobacteria* dapat memproduksi metabolit yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Egamberdieva dkk. (2015) juga menyatakan bahwa adanya interaksi antara bakteri dengan rizosfer tanaman mampu menyebabkan bakteri memproduksi senyawa fitoterapi. Oleh karena itu, kemampuan metabolit *rhizobacteria* tanaman *A. paniculata* dalam menghambat pertumbuhan bakteri, khususnya *Salmonella Typhi*, perlu dikaji lebih lanjut.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana daya hambat metabolit *rhizobacteria* tanaman *Andrographis paniculata* terhadap *Salmonella* Typhi ATCC 58105535?
2. Spesies bakteri apakah yang unggul dalam menghambat pertumbuhan *Salmonella* Typhi ATCC 58105535?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Menganalisis daya hambat metabolit *rhizobacteria* tanaman *Andrographis paniculata* terhadap *Salmonella* Typhi ATCC 58105535.
2. Mengidentifikasi spesies *rhizobacteria* tanaman *A. paniculata* yang unggul dalam menghambat pertumbuhan *Salmonella* Typhi ATCC 58105535.

1.4 Manfaat Penelitian

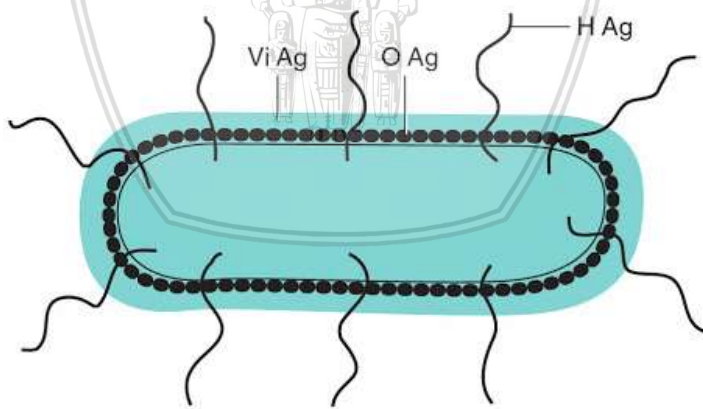
Manfaat dari penelitian ini adalah meningkatkan pengetahuan mengenai potensi *rhizobacteria* tanaman *A. paniculata* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella* Typhi dan memberikan alternatif terbaru dalam pengobatan penyakit demam tifoid.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Salmonella Typhi* dan Demam Tifoid

Salmonella Typhi atau disebut pula *Salmonella enterica* serotype Typhi merupakan salah satu bakteri yang termasuk ke dalam Famili Enterobacteriaceae. *Salmonella Typhi* merupakan bakteri motil dan bersifat anaerob fakultatif. Bakteri ini termasuk kelompok Gram negatif dan memiliki tiga antigen utama, yaitu antigen flagellar atau H, antigen somatik atau O, dan antigen Vi (Gambar 1). Antigen O terletak pada permukaan membran luar. Antigen Vi merupakan antigen yang membedakan *S. Typhi* dengan *Salmonella* lainnya (Ugboko & De, 2014). Antigen O merupakan lipopolisakarida dan bersifat *heat-stable*, sedangkan antigen H bersifat *heat-labile*. Antigen Vi berbentuk kapsul dan tersusun dari polisakarida yang berada pada permukaan *S. Typhi* dan bersifat *heat-labile*. Antigen kapsular tersebut memiliki peran yang penting dalam mencegah terjadinya fagositosis terhadap *Salmonella* (Mahon dkk., 2015).



(Mahon dkk., 2015)

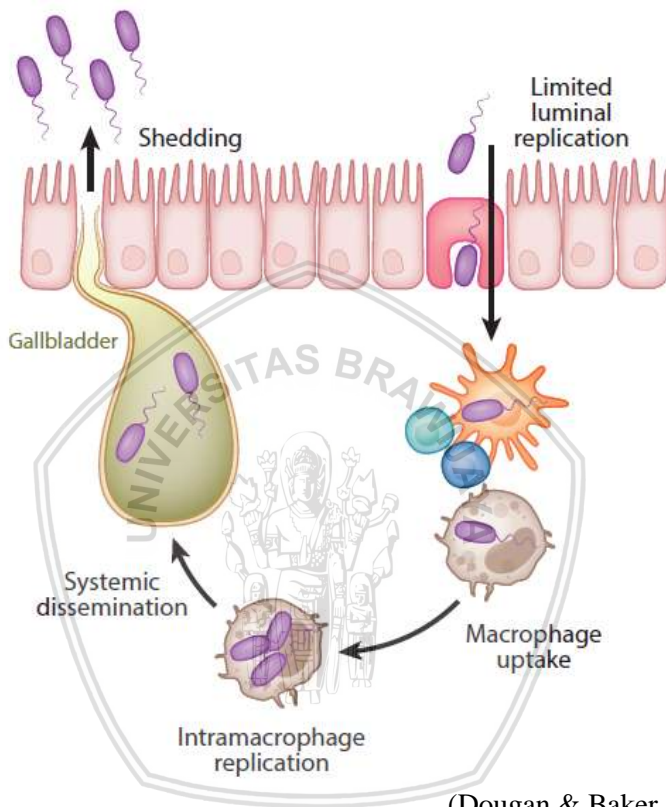
Gambar 1. Struktur antigenik *Salmonella Typhi*

Demam tifoid merupakan penyakit yang disebabkan oleh *Salmonella* Typhi (Zaki & Karande, 2011). Mengonsumsi air dan makanan yang terkontaminasi oleh *S. Typhi* dapat menjadi penyebab demam tifoid. *Salmonella* Typhi mampu bertahan hidup di air selama beberapa hari sehingga air yang terkontaminasi oleh bakteri tersebut dapat berperan sebagai perantara utama penyebab demam tifoid. Gejala demam tifoid adalah demam yang kemudian disertai dengan sakit kepala, kedinginan, mual, batuk, dan nyeri otot atau mialgia (Paul & Bandyopadhyay, 2017). Mayoritas penderita demam tifoid adalah pasien berumur 5-25 tahun. Ketika seseorang terinfeksi *S. Typhi*, tidak ada gejala yang terlihat selama 7-14 hari. Permulaan bakteremia ditandai dengan gejala demam. Awalnya demam yang dirasakan oleh penderita tidak terlalu tinggi suhunya tetapi suhu tersebut semakin meningkat hingga minggu kedua, yaitu sekitar 39-40 °C. Tingkat hemoglobin, jumlah sel darah putih, dan jumlah platelet umumnya normal atau berkurang. Komplikasi yang dapat diderita oleh penderita demam tifoid adalah pendarahan *gastrointestinal*, myocarditis, anemia, pneumonia, bronkitis, hepatitis, dan meningitis (Parry dkk., 2002).

2.2 Patogenesis *Salmonella* Typhi

Infeksi oleh *Salmonella* Typhi umumnya terjadi karena penderita mengonsumsi makanan dan/atau air yang terkontaminasi oleh *S. Typhi*. Seseorang dianggap menderita demam tifoid apabila terdapat sekitar 10.000 *S. Typhi* di dalam tubuhnya. Jumlah tersebut sedikit bervariasi antarindividu dan pada keadaan yang berbeda. *Salmonella* Typhi dapat menginfeksi membran mukosa pada usus dengan melalui sel *microfold* (M), pada tahap infeksi awal, bakteri ini dapat menyebar tanpa dikenali oleh sistem imun (Gambar 2) (Dogan & Baker, 2014). Untuk dapat mencapai usus halus, bakteri ini harus melalui *barrier* asam lambung. Nilai pH yang rendah akan menurunkan jumlah infeksi. Begitu bakteri mencapai usus halus, bakteri tersebut menempel pada sel mukosa yang kemudian menginvasi mukosa. *Salmonella* Typhi dapat masuk melalui sel M yang merupakan suatu epitel khusus yang terletak di atas *Peyer's patches* kemudian bakteri ini menuju ke jaringan limfoid di bawahnya. Bakteri tersebut akan berpindah ke beberapa lokasi lain, sebagian masuk ke folikel limfoid

pada usus dan kelenjar getah bening, sedangkan sebagian lagi masuk ke sel retikuloendotelial pada hati dan limpa (Parry dkk., 2002).



(Dougan & Baker, 2014)

Gambar 2. Infeksi oleh *Salmonella Typhi*

Salmonella Typhi tetap dapat hidup dan bermultiplikasi meski difagosit oleh sel-sel fagositik berinti tunggal di folikel limfoid, hati, dan limpa. Bakteri tersebut dapat menembus masuk dari dalam sel terinfeksi ke peredaran darah apabila dalam suatu kondisi tertentu yang dipengaruhi oleh banyaknya jumlah bakteri, virulensinya, dan respon yang diberikan oleh inangnya. Masa inkubasi dari fase bakteremik umumnya 7 hingga 14 hari, pada fase ini bakteri tersebut benar-benar

tersebar luas. Organ-organ yang umumnya terinfeksi setelah bakteri menyebar dalam darah di antaranya ialah kantong empedu, hati, limpa, sumsum tulang, dan *Peyer's patches*. Bakteri tersebut dapat menginfeksi kantong empedu melalui aliran darah, bahkan yang lebih parah lagi, bakteri yang telah menginvasi kantong empedu akan menyebar melalui cairan empedu tersebut. *Salmonella Typhi* yang diekskresikan bersama dengan cairan empedu akan menginvasi bagian dinding usus yang lainnya atau diekskresikan dalam bentuk feses. Jumlah bakteri pada penderita demam tifoid akut rata-rata sekitar satu bakteri per mililiter darah dan sepuluh bakteri per mililiter sumsum tulang (Parry dkk., 2002).

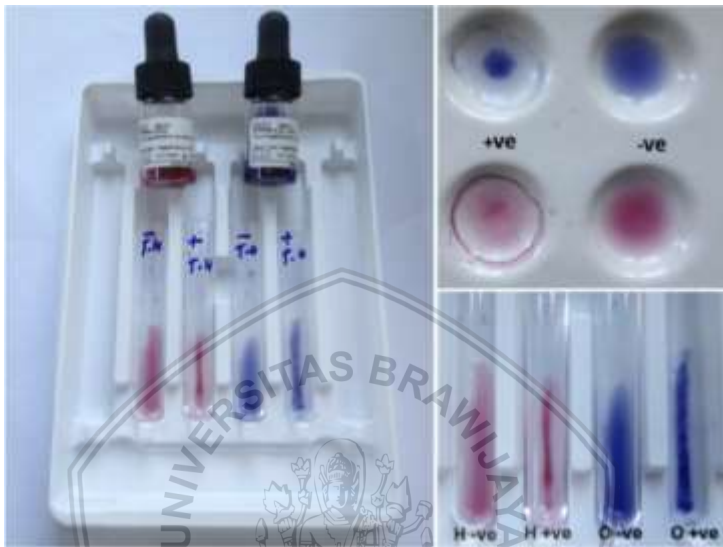
2.3 Diagnosis Demam Tifoid

Demam tifoid dapat didiagnosis dengan berbagai cara, yaitu isolasi *Salmonella Typhi* dari cairan tubuh dan menggunakan uji Widal serta diagnosis berbasis laboratorium lainnya (Sattar dkk., 2013). Demam tifoid dapat didiagnosis menggunakan kultur darah dan kultur sumsum tulang. Kultur darah diinkubasi pada suhu 37 °C dan diamati turbiditas dan pembentukan gas setelah 1, 2, 3, dan 7 hari. Kultur darah yang menunjukkan pertumbuhan atau memiliki hasil positif pada hari ke-1, 2, dan 3 dikulturkan ke media *blood agar*. Semua kultur darah disubkultur pada hari ke-7 sebelum dinyatakan sebagai sampel negatif (World Health Organization, 2003).

Uji Widal dilakukan untuk mengamati aglutinasi antibodi dengan antigen O dan H pada *S. Typhi* menggunakan serum penderita. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya gumpalan, sedangkan hasil negatif tidak menghasilkan gumpalan (Gambar 3) (Zorgani & Ziglam, 2014). Metode diagnosis lainnya adalah menggunakan antibodi monoklonal yang dapat mendeteksi antigen spesifik *S. Typhi* yang berada pada serum atau antigen Vi *S. Typhi* di dalam urin (Bhutta, 2006). Uji IDL Tubex[®] dan uji Typhidot[®] juga dapat digunakan untuk mendiagnosis tifoid secara cepat. Uji IDL Tubex[®] dapat mendeteksi antibodi yang diujikan oleh antigen *S. Typhi* yaitu antigen O9. Antigen tersebut digunakan karena bersifat sangat spesifik. Diagnosis ini dilakukan dengan menggunakan reagen A dan B. Hasil diagnosis diamati dari warna yang muncul. Warna merah menunjukkan hasil uji negatif sedangkan warna biru menunjukkan hasil uji positif. Uji Typhidot[®]

repository.ub.ac.id

menggunakan antigen 50 kDa untuk mendeteksi antibodi IgM dan IgG spesifik untuk *S. Typhi* (World Health Organization, 2003).



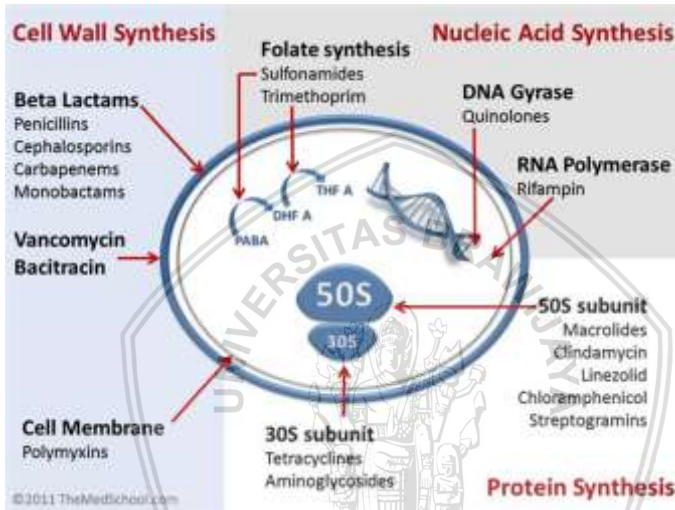
(Zorgani & Ziglam, 2014)

Gambar 3. Hasil uji Widal untuk deteksi demam tifoid

2.4 Mekanisme Antibiotik dalam Menghambat Pertumbuhan *Salmonella Typhi*

Demam tifoid yang disebabkan oleh *Salmonella Typhi* dapat diobati dengan mengonsumsi antibiotik. Beberapa antibiotik yang digunakan untuk mengobati demam tifoid dapat dilihat pada Tabel 1. Kelompok antibiotik fluoroquinolone merupakan salah satu antibiotik yang efektif dalam menghambat *Salmonella Typhi*. Selain antibiotik tersebut, generasi ketiga cephalosporin, yaitu ceftriaxone, cefixime, cefotaxime, dan cefoperazone, serta azithromycin, chloramphenicol, amoxicillin, dan trimethoprim-sulfamethoxazole juga efektif untuk pengobatan demam tifoid (Parry dkk., 2002; Ugboko & De, 2014). Mekanisme antibiotik dalam menghambat bakteri dapat terbagi menjadi empat, yaitu menghambat sintesis dinding sel bakteri, sintesis DNA bakteri, sintesis protein, dan sintesis folat (Gambar 4). Contoh

antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel bakteri adalah penicillin dan cephalosporin. Kedua antibiotik tersebut masuk ke dalam sel bakteri dan berikatan dengan enzim *penicillin-binding proteins*. Pengikatan tersebut dapat menghancurkan dinding sel bakteri dan dalam hal ini antibiotik tersebut bersifat bakterisidal (Kaufman, 2011).



(Moore, 2017)

Gambar 4. Mekanisme kerja antibiotik terhadap sel bakteri

Sintesis DNA bakteri dapat dihambat oleh golongan quinolone, contohnya adalah ciprofloxacin. Replikasi DNA dan pembelahan sel merupakan proses yang penting dalam memproduksi sel bakteri yang baru, oleh karena itu sintesis DNA bakteri patogen menjadi salah satu hal yang perlu dihambat oleh antibiotik. Quinolone dapat menghambat kerja enzim DNA gyrase dan topoisomerase IV. Kedua enzim tersebut penting dalam proses replikasi DNA. Penghambatan sintesis DNA bakteri menyebabkan kematian pada sel bakteri (Kaufman, 2011). Sintesis protein mampu dihambat oleh antibiotik aminoglycoside, tetracycline, dan macrolide. Aminoglycoside (gentamicin) merupakan salah satu antibiotik bakterisidal yang mampu menyebabkan adanya

kesalahan dalam pembacaan kode pada mRNA dan hal tersebut mampu menyebabkan disfungsi protein. Tetracycline dapat menghambat sintesis protein dengan menghalangi molekul transfer RNA untuk mentranspor asam amino esensial pada pembentukan protein. Macrolide yang berikatan dengan salah satu subunit ribosom dapat menghambat fungsi ribosom. Trimethoprim dan sulphonamide merupakan antibiotik yang dapat menghambat sintesis folat. Folat merupakan salah satu komponen yang penting dalam pembentukan DNA. Kedua antibiotik tersebut bersifat bakteriostatik (Kaufman, 2011).

Tabel 1. Antibiotik dan mekanisme penghambatan bakteri

Antibiotik	Kelompok	Mekanisme
Chloramphenicol	Chloramphenicol	Menghambat sintesis protein
Erythromycin	Macrolides	
Azithromycin	Macrolides	
Ampicillin	Penicillin	Menghambat sintesis dinding sel
Amoxycillin	Penicillin	
Augmentin	Penicillin	
Ceftriaxone	Cephalosporin	
Cefotaxim	Cephalosporin	
Ciprofloxacin	Quinolone	Menghambat sintesis DNA
Perfloxacin	Quinolone	
Nalidixic acid	Quinolone	
Cotrimoxazole	Sulfonamide	Antimetabolit

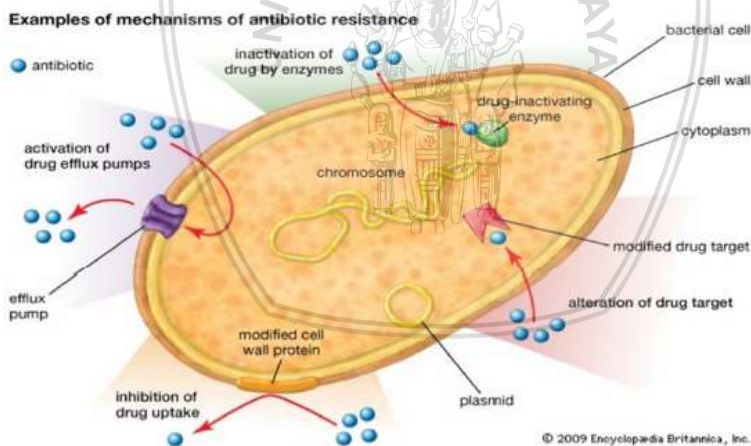
(Ugboko & De, 2014)

2.5 Resistensi *Salmonella Typhi* terhadap Antibiotik

Mekanisme resistensi *Salmonella Typhi* terhadap antibiotik dapat dibagi menjadi dua, yaitu mekanisme yang dimediasi plasmid dan mekanisme yang dimediasi oleh DNA kromosomal. Plasmid adalah DNA ekstrakromosomal yang dapat membawa dan mentransfer beberapa gen resistensi di antara bakteri. Plasmid *incompatibility group* (Inc) HII adalah vektor yang penting dalam resistensi *S. Typhi* (Zaki & Karande, 2011). Resistensi *S. Typhi* terhadap antibiotik dapat disebabkan oleh adanya inaktivasi antibiotik, *efflux* atau transpor

antibiotik, modifikasi sisi target antibiotik, dan berkurangnya permeabilitas antibiotik (Gambar 5). Resistensi terhadap antibiotik umumnya disebabkan oleh adanya perubahan genetik pada suatu organisme. Inaktivasi antibiotik dapat disebabkan oleh adanya modifikasi bahan kimia. Salah satu contohnya adalah hidrolisis cincin β -lactam pada penicillin oleh enzim penicillinase yang dapat memutus cincin β -lactam tersebut.

Salmonella Typhi yang resisten terhadap antibiotik mengandung chloramphenicol acetyltransferase tipe I yang dapat menginaktivasi chloramphenicol melalui asetilasi. Chloramphenicol mengandung dua gugus hidroksil yang dapat diasetilasi oleh enzim chloramphenicol acetyltransferase tipe I dengan acetyl CoA sebagai donor. *Efflux* antibiotik bekerja dengan memompa obat ke luar dari sel setelah obat tersebut masuk ke dalam sel. Beberapa patogen memiliki pompa *efflux* yang terletak di membrannya yang berperan dalam mekanisme tersebut (Ugboko & De, 2014).



(Ugboko & De, 2014)

Gambar 5. Mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik

Resistensi bakteri terhadap antibiotik juga dapat terjadi ketika enzim target atau struktur sel patogen telah dimodifikasi sehingga menyebabkannya tidak sensitif terhadap obat tersebut. Perubahan

permeabilitas membran dapat terjadi ketika ada informasi genetik yang mengubah protein dalam membran. Salah satu contoh perubahan tersebut adalah perubahan sistem transpor membran yang menyebabkan antibiotik tidak mampu melewati membran. Resistensi *S. Typhi* terhadap tetracyclin, quinolon, dan aminoglycosida terjadi akibat adanya perubahan permeabilitas membran sel. Penurunan permeabilitas membran juga dapat menyebabkan resistensi terhadap sulfonamide (Ugboko & De, 2014). Resistensi yang dimediasi oleh kromosom dapat terjadi akibat adanya mutasi gen yang mengode target obat atau sistem transpor di membran. Mekanisme resistensi bakteri terhadap fluoroquinolon disebabkan oleh adanya mutasi pada salah satu gen atau lebih yang mengkode target primer dan sekunder obat. Area mutasi tersebut disebut dengan *quinolone resistance-determining region* (QRDR). Mutasi menyebabkan adanya substitusi asam amino, perubahan struktur target protein, dan resistensi obat (Redgrave dkk., 2014). Resistensi *S. Typhi* terhadap fluoroquinolon umumnya dimediasi oleh mutasi kromosom, yaitu pada DNA gyrase yang dikode oleh *gyrA* dan *gyrB* serta topoisomerase IV yang dikode oleh *parC* dan *parE* tetapi dapat pula dimediasi oleh plasmid (Wain dkk., 2014).

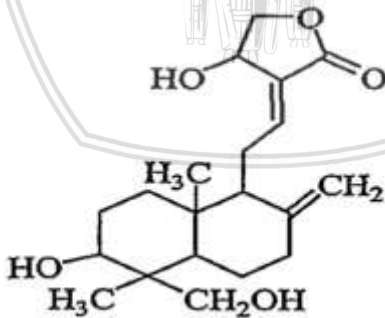
2.6 Multidrug-Resistant Typhoid Fever (MDRTF)

Multidrug-resistant typhoid fever atau MDRTF adalah demam tifoid yang disebabkan oleh *Salmonella Typhi* yang resisten terhadap antibiotik chloramphenicol, ampicillin, dan co-trimoxazole. Tidak ada ciri klinis khusus awal yang dapat membedakan penyakit demam tifoid yang disebabkan oleh *S. Typhi* strain *multidrug-resistant* atau *S. Typhi* biasa. Umumnya kasus MDRTF terjadi pada anak-anak yang berumur kurang dari lima tahun. Seseorang dapat diduga menderita MDRTF jika tidak ada perubahan kondisi setelah 5-7 hari mengonsumsi *first-line antibiotic*, di antaranya adalah chloramphenicol, ampicillin, dan trimethoprim/sulfamethoxazol serta mengalami komplikasi yang semakin memburuk saat mengonsumsi antibiotik. Komplikasi penyakit MDRTF adalah komplikasi gastrointestinal (perdarahan, hepatitis, peritonitis, dan kolesistitis), komplikasi sistem pernapasan (bronkopneumonia), komplikasi sistem saraf pusat (ensefalopati, meningitis, dan *cerebellar ataxia*),

komplikasi ginjal (hipokalemia, gagal ginjal akut, glomerulonefritis, dan hipernatremia), komplikasi jantung (miokarditis), dan komplikasi lainnya (Zaki & Karanade, 2011).

2.7 Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) merupakan tanaman obat yang penting dan banyak digunakan di seluruh dunia. *Andrographis paniculata* merupakan tanaman yang termasuk ke dalam Famili Acanthaceae. Bagian tanaman *A. paniculata* yang biasanya dimanfaatkan sebagai obat adalah daun dan akarnya. Tanaman *A. paniculata* memiliki kandungan diterpenoid, diterpen glikosida, lakton, flavonoid, dan flavonois glikosida. Akar *A. paniculata* mengandung metabolit 1,2-dihydroxy-6,8-dimethoxyanthone; 1,8-dihydroxy-3,7-dimethoxy-xanthone; 3,7,8-trimethoxy-1-hydroxyxanthone; dan 4,8-dihydroxy-2,7-dimethoxyxanthone). Andrographolide merupakan metabolit utama yang berperan dalam aktivitas farmakologi. Struktur kimia andrographolide dapat dilihat pada Gambar 6. *Andrographis paniculata* umumnya bermanfaat sebagai antiinflamasi, antibakteri, antivirus, dan antiparasit (Hossain dkk., 2014).



(Banerjee dkk., 2017)

Gambar 6. Struktur kimia andrographolide

Andrographis paniculata dalam bentuk bubuk kasar memiliki aktivitas antibakteri secara in vitro terhadap *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri

juga ditemukan pada ekstrak andrographolide dalam bentuk cairan. Ekstrak etanol *A. paniculata* dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* strain enterohemorrhagic. Ekstrak kloroform *A. paniculata* dengan konsentrasi 0,05 mg/mL mampu menghambat parasit penyakit malaria dalam waktu inkubasi 24 jam. Hal yang sama juga dapat dihambat oleh ekstrak metanol dengan konsentrasi 2,5 mg/mL dalam waktu 48 jam. Ekstrak etanol *A. paniculata* efektif dalam menghambat penyebab infeksi saluran pernapasan bagian atas. Aktivitas antimikroba yang dimiliki oleh *A. paniculata* mampu menghambat sembilan strain bakteri, yaitu *Salmonella* Typhi, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Legionella pneumophila*, dan *Bordetella pertussis* (Jayakumar dkk., 2013).

2.8 Potensi *Rhizobacteria* sebagai Antibakteri

Rizosfer terbagi menjadi tiga zona, yaitu endorizosfer, *rhizoplane*, dan ektorizosfer. Endorizosfer adalah zona endodermis dan korteks, *rhizoplane* adalah zona medial yang berdekatan dengan akar dan termasuk di dalamnya adalah epidermis akar, serta zona terluar yang disebut dengan ektorizosfer. Rizosfer merupakan area yang berada di sekitar akar tanaman yang mengandung banyak organisme, yaitu bakteri, fungi, alga, virus, protozoa, dan lain-lain. *Rhizobacteria* dapat memproduksi metabolit yang menghambat pertumbuhan atau aktivitas mikroorganisme lain. Terdapat lebih dari 10.000 antibiotik berbeda yang dihasilkan oleh bakteri Gram positif dan Gram negatif, tetapi hanya 100 di antaranya yang dapat dikomersialisasikan untuk melawan penyakit manusia, hewan, dan tanaman. Hal tersebut disebabkan hanya senyawa dengan toksisitas selektif yang dapat digunakan secara klinis. Masing-masing bakteri menghasilkan senyawa antibiotik yang berbeda-beda efeknya terhadap mikroorganisme lain. Metabolit yang diproduksi oleh mikroorganisme rizosfer umumnya adalah *volatile organic compound* (VOC) yang dapat memodulasi pertumbuhan tanaman. Senyawa tersebut juga dapat berperan sebagai antibakteri yang kuat untuk beberapa mikroorganisme (Mendes dkk., 2013; Geetanjali & Jain, 2016).

Tanaman obat merupakan salah satu sumber yang kaya senyawa bioaktif. Senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tanaman obat

tersebut bersifat lebih aman untuk manusia dan lingkungan jika dibandingkan dengan obat sintetis untuk mengobati berbagai penyakit. Bakteri yang terkandung di dalam rizosfer tanaman obat mampu memproduksi senyawa fitoterapi dan meningkatkan pertumbuhan tanaman obat ketika bakteri tersebut berinteraksi dengan rizosfer tanaman. Bakteri tersebut juga dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder tanaman obat dengan mengubah keseimbangan hormon tanaman dan meningkatkan status fosfor pada tanaman. Mikroorganisme rizosfer memiliki peran yang penting dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman, ketersediaan nutrisi, dan kualitas senyawa yang dapat digunakan sebagai obat. Tanaman melepaskan senyawa organik melalui eksudat akar sehingga menyediakan lingkungan yang kaya nutrisi untuk aktivitas mikroorganisme tanah. Aktivitas bakteri tanah sangat penting untuk memastikan kecukupan suplai nutrisi tanaman (Egamberdieva dkk., 2015).

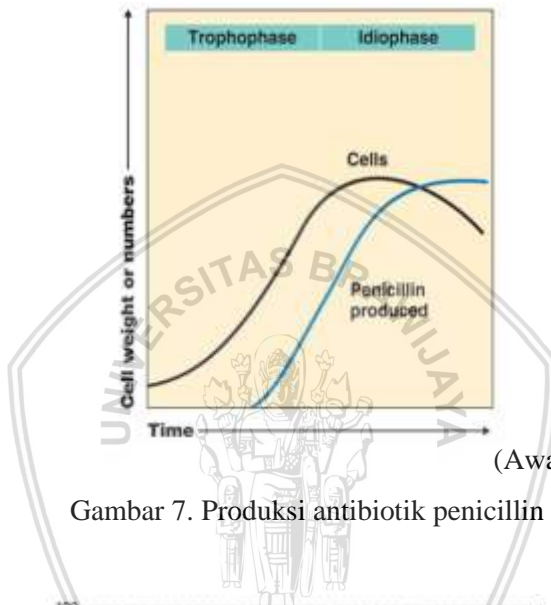
Rhizobacteria yang berinteraksi dengan bakteri patogen memiliki aktivitas antagonis atau antimikroba dan memiliki berbagai mekanisme. Mekanisme yang dilakukan oleh *rhizobacteria* adalah penghambatan patogen dengan antibiotik, toksin, dan biosurfaktan, kompetisi nutrisi, degradasi faktor patogenisitas milik patogen seperti toksin, serta parasitisme yang melibatkan produksi ekstraselular dan enzim pendegradasi dinding sel (Berg & Alavi, 2013).

2.9 Senyawa Metabolit Bakteri sebagai Antibiotik

Mikroorganisme memiliki kemampuan untuk memproduksi berbagai metabolit. Contohnya adalah *Streptomyces griseus* dan *Bacillus subtilis* yang dapat memproduksi lebih dari 50 jenis bioaktif metabolit sekunder, seperti antibiotik, peptida, quinolon, terpenoid, naftalen, dan lain-lain. Salah satu antibiotik yang diproduksi oleh mikroorganisme adalah penicillin. Penicillin hanya diproduksi setelah fase logaritmik sel (trofofase), yaitu pada fase stasioner (idiofase) (Gambar 7) (Awad dkk., 2012).

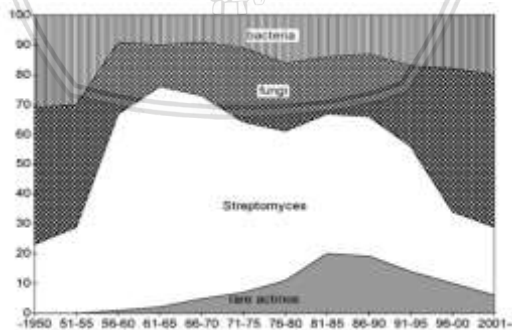
Bakteri, fungi, alga, koral, tanaman, dan hewan tingkat rendah mampu mensintesis senyawa antibiotik. Mayoritas metabolit sekunder disintesis oleh mikroorganisme berfilamen, seperti Actinomycetes dan kapang. Di alam terdapat sekitar 40 % fungi berfilamen dan

Actinomycetes yang mampu memproduksi antibiotik (Gambar 8). Beberapa antibiotik juga dapat diisolasi dari bakteri, seperti *Bacillus* dan *Mycobacterium*. *Mycobacterium* dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibiotik (Awad dkk., 2012).



(Awad dkk., 2012)

Gambar 7. Produksi antibiotik penicillin



(Awad dkk., 2012)

Gambar 8. Perbandingan mikroorganisme yang mampu menghasilkan antibiotik

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan mulai November 2017 hingga Juni 2018. Sampel tanah rizosfer *Andrographis paniculata* diperoleh dari tiga tanah berbeda di Materia Medica Batu dengan koordinat lokasi S07°52.020' E112°31.200'; S07°52.021' E112°31.200'; dan S07°52.012' E112°31.186' (Gambar 9). Tanah yang letaknya di dekat akar tanaman *A. paniculata* diambil menggunakan sekop tanah kemudian dimasukkan ke dalam plastik dan disimpan di dalam *cool box*. Sampel tanah dianalisis lebih lanjut di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.



Gambar 9. Lokasi pengambilan sampel tanah *Andrographis paniculata* melalui Google Earth

3.2 Pengukuran Faktor Lingkungan Tanah

Faktor lingkungan tanah yang diukur adalah intensitas cahaya, suhu, pH, kelembaban, dan bahan organik tanah. Intensitas cahaya

diukur menggunakan lux meter, sedangkan suhu tanah diukur menggunakan termometer tanah. Keasaman tanah diukur dengan menimbang 10 g tanah dan ditambahkan 25 mL akuades kemudian diaduk hingga homogen dan diukur menggunakan pH meter. Kelembaban tanah diukur dengan menimbang 100 g tanah di dalam Cawan Petri. Tanah dikeringkan di dalam oven pada suhu 105 °C dan ditimbang kembali. Selain itu, berat Cawan Petri kosong juga ditimbang. Berat kering tanah dihitung dengan rumus 1. Kelembaban tanah dihitung berdasarkan berat kering tanah menggunakan persamaan 2 (Carter & Gregorich, 2007; DeAngelis, 2007).

$$\text{Berat kering tanah (\%)} = \frac{(wt-wt')}{(wt-w)} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan:

wt = berat tanah dan Cawan Petri sebelum dikeringkan (g)

wt' = berat tanah dan Cawan Petri setelah dikeringkan (g)

w = berat Cawan Petri kosong (g)

$$\text{Kelembaban tanah (\%)} = 100 - \text{berat kering tanah} \dots\dots\dots (2)$$

Bahan organik tanah diukur dengan cara 1 g tanah kering dibakar di dalam *furnace* hingga mencapai suhu 500 °C kemudian beratnya ditimbang. Bahan organik tanah dihitung dengan persamaan 3 (Robertson, 2011).

$$\text{Bahan organik tanah (\%)} = \frac{(a-b)}{a} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan:

a = berat tanah sebelum dibakar (g)

b = berat tanah setelah dibakar (g)

3.3 Isolasi *Rhizobacteria Andrographis paniculata*

Tanah rizosfer tanaman *Andrographis paniculata* diambil sebanyak 25 g dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 mL yang telah berisi 225 mL garam fisiologis (NaCl 0,85 %) sebagai pengenceran 10⁻¹. Suspensi sebanyak satu mililiter dari pengenceran tersebut dipindahkan ke tabung reaksi berisi sembilan mililiter garam

fisiologis sebagai pengenceran 10^{-2} . Suspensi dari pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 0,1 mL menggunakan mikropipet kemudian dipindahkan ke Cawan Petri berisi media *Nutrient Agar* (NA) dan disebar menggunakan Drigalski. Tahapan tersebut dilakukan hingga pengenceran 10^{-6} . Kultur dalam Cawan Petri diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Masing-masing isolat bakteri yang tumbuh dihitung jumlah koloninya dengan teknik *total plate count* menggunakan persamaan 4 (Abiala dkk., 2015).

$$\text{TPC (CFU/g)} = \Sigma \text{ koloni} \times \frac{1}{\text{fp}} \times \frac{1}{\text{V}} \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan:

TPC = *total plate count* (CFU/g)

Σ koloni = jumlah koloni hitung

fp = faktor pengenceran

V = volume suspensi (mL)

Bakteri yang dihitung adalah yang koloninya berjumlah 30-300 koloni pada masing-masing pengenceran. Isolat bakteri digoreskan ke Cawan Petri baru berisi media NA dengan metode *quadrant streak* hingga diperoleh kultur murni. Untuk mengecek kemurniannya, koloni tunggal bakteri diwarnai menggunakan metode cat Gram dengan pewarna kristal violet, iodine, alkohol, dan safranin. Kultur isolat bakteri yang telah murni disimpan di dalam NA miring dan disimpan di dalam kulkas dengan suhu 4°C (Abiala dkk., 2015).

3.4 Skrining *Rhizobacteria Andrographis paniculata* sebagai Antibakteri *Salmonella Typhi* ATCC 58105535

Skrining potensi *rhizobacteria* dilakukan dengan menggunakan teknik *disc diffusion* menurut rancangan acak lengkap dan tiga kali ulangan. Parameter yang diamati adalah daya hambat *rhizobacteria* terhadap *Salmonella Typhi* ATCC 58105535. *Salmonella Typhi* ATCC 58105535 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya dan disubkulturkan di dalam media NA. Bakteri tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat *rhizobacteria* dikulturkan di dalam *Nutrient Broth* (NB) pada suhu 30°C selama 24 jam dalam *rotary shaker incubator* dengan

kecepatan 120 rpm kemudian diukur densitas optiknya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Densitas optik sel isolat bakteri disamakan menjadi densitas optik terendah, yaitu 0,3 (Ali & Sultana, 2016).

Salmonella Typhi ATCC 58105535 dikulturkan dalam 10 mL media NB pada suhu 37 °C selama satu jam kemudian densitas sel dihitung menggunakan hemositometer hingga mencapai 10^7 CFU/mL. Suspensi bakteri *S. Typhi* sebanyak 0,1 mL diinokulasikan ke media NA dengan metode cawan sebar kemudian disimpan di kulkas pada suhu 4 °C selama satu jam. Kultur cair *rhizobacteria* dengan densitas optik 0,3 diteteskan ke atas kertas cakram berukuran 5,5 mm kemudian diletakkan pada permukaan media NA yang sudah disebar bakteri patogen. Cawan Petri disimpan di dalam kulkas pada suhu 4 °C selama 30 menit kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram diukur dalam satuan milimeter menggunakan jangka sorong (Muhammad dkk., 2011; Jahangirian dkk., 2013). Data dianalisis menggunakan ANOVA dengan $\alpha=0,05$ dan uji lanjutan Tukey (Banerjee dkk., 2017).

3.5 Pembuatan Kurva Standar dan Kurva Pertumbuhan Isolat *Rhizobacteria* Tanaman *Andrographis paniculata*

Isolat *rhizobacteria* yang terpilih dikulturkan di dalam 60 mL media NB di dalam *rotary shaker incubator* pada suhu 30 °C dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Kultur cair bakteri digunakan untuk membuat kurva standar dan kurva pertumbuhan bakteri. Kurva standar dibuat dengan cara menginokulasikan bakteri ke media NB steril dengan perbandingan 8:0; 7:1; 6:2; 5:3; 4:4; 3:5; 2:6; 1:7; dan 0:8. Empat mililiter suspensi bakteri dan media NB diambil untuk dihitung jumlah sel bakteri menggunakan hemositometer dengan persamaan 5. Suspensi sebanyak 1,5 mL diambil untuk diukur densitas optiknya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Nilai densitas optik dan jumlah sel bakteri yang digunakan untuk membuat kurva standar (Hall dkk., 2013).

Kultur bakteri sebanyak empat mililiter diinokulasikan ke dalam 40 mL media NB untuk pembuatan kurva standar. Sampel diinkubasi di *rotary shaker incubator* pada suhu 30 °C dengan kecepatan 120 rpm

selama 24 jam. Sampel diambil sebanyak 1,5 mL pada tiap 1-3 jam sekali dalam waktu 24 jam dengan total pengambilan sampel sebanyak 14 kali kemudian diukur densitas optiknya menggunakan spektrofotometer (600 nm). Jumlah sel bakteri dihitung berdasarkan rumus regresi yang diperoleh dari kurva standar. Waktu *sampling* dan jumlah sel bakteri digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan (Hall dkk., 2013).

$$\text{Jumlah sel} = \frac{\text{Jumlah sel pada semua kotak}}{\text{Jumlah kotak} \times 4 \times 10^{-6}} \dots\dots\dots (5)$$

3.6 Uji Potensi Metabolit *Rhizobacteria Andrographis paniculata* sebagai Antibakteri *Salmonella Typhi* ATCC 58105535

Uji potensi metabolit *rhizobacteria* dilakukan dengan menggunakan teknik *disc diffusion* menurut rancangan acak lengkap dan tiga kali ulangan. Parameter yang diamati adalah daya hambat metabolit *rhizobacteria* terhadap *Salmonella Typhi* ATCC 58105535. Isolat rizobakteri *Andrographis paniculata* ditumbuhkan dalam media NB dan diinkubasi di dalam *rotary shaker incubator* pada suhu 30 °C dengan kecepatan 120 rpm hingga mencapai fase stasioner (18, 21, dan 24 jam). Kultur cair disentrifugasi pada suhu 4 °C, 10.000 rpm, selama 15 menit; supernatan diambil untuk uji selanjutnya. Supernatan diukur nilai pH-nya menggunakan pH meter. Supernatan dibagi dua untuk perlakuan pH diatur menjadi netral dan pH tidak diatur kemudian disaring menggunakan membran filter *Minisart Syringe Filter Cellulose Acetate* 0,2 µm.

Salmonella Typhi ATCC 58105535 yang memiliki densitas sel 10⁷ CFU/mL dan volume 0,1 mL disebar di media NA dan disimpan pada suhu 4 °C selama satu jam kemudian ditunggu hingga kering. Supernatan *rhizobacteria* yang mengandung metabolit tersebut diujikan dengan media NA, yang sudah disebarkan bakteri patogen, dengan cara 50 µL supernatan diteteskan di atas kertas cakram dengan diameter 5,5 mm kemudian diletakkan pada permukaan media NA dan disimpan di dalam kulkas pada suhu 4 °C selama 30 menit. Kontrol negatif perlakuan menggunakan kertas cakram yang diteteskan akuades steril. Kultur dalam Cawan Petri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Diameter zona hambat diukur (Doughari & Okafor,

2008; Sinha, 2016). Data dianalisis menggunakan ANOVA dengan $\alpha=0,05$ dan Uji Tukey (Banerjee dkk., 2017).

3.7 Identifikasi *Rhizobacteria Andrographis paniculata* Berdasarkan Sekuen 16S rDNA

Deoxyribose Nucleic Acid (DNA) bakteri unggul dieskraksi menggunakan *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit*. Isolat bakteri dikulturkan pada media NA dengan metode *quadrant streak* dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Sampel untuk ekstraksi DNA disiapkan dengan cara lima ose bakteri diinokulasi ke dalam 100 μL ddH₂O di dalam *microtube*. *Microtube* disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama satu menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet disimpan. Dua ratus mikroliter Gram+ *Buffer* yang sudah dicampurkan dengan lisozim ditambahkan ke dalam sampel pada *microtube* dan diresuspensi kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Selama inkubasi berlangsung, *microtube* dibolak-balik tiap sepuluh menit. Dua puluh mikroliter Proteinase K + ddH₂O ditambahkan ke dalam sampel dan dihomogenkan. Sampel diinkubasi di *water bath* pada suhu 60 °C selama sepuluh menit dan tabung dibolak-balik tiap tiga menit.

Buffer GB sebanyak 200 μL ditambahkan ke dalam sampel dan dihomogenkan selama 10 detik kemudian diinkubasi pada suhu 70 °C selama 10 menit. Tabung dibolak-balik tiap tiga menit selama inkubasi. Selain sampel, *Elution Buffer* dipanaskan pula pada suhu 70 °C. Proses DNA *binding* dilakukan dengan menambahkan 200 μL etanol absolut ke sampel hasil lisis dan dikocok dengan segera kemudian *GD Column* diletakkan di dalam dua mililiter *Collection Tube*. Sampel dipindahkan ke *GD Column* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama dua menit. *Collection Tube* yang mengandung cairan dibuang dan *GD Column* diletakkan di dalam *Collection Tube* baru.

Proses *washing* dilakukan dengan menambahkan 400 μL *WI Buffer* ke dalam *GD Column* dan disentrifugasi 14.000 rpm selama 30 detik. Cairan yang tersaring dari *GD Column* dibuang. *Wash Buffer* sebanyak 600 μL ditambahkan ke dalam *GD Column* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. Cairan di dalam *Collection Tube* dibuang dan *GD Column* diletakkan kembali

di dalam *Collection Tube*. *Tube* disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama tiga menit.

Tahap *elution* dilakukan dengan menambahkan 50 μL *pre-heated Elution Buffer* ke bagian tengah *GD Column* yang diletakkan di *microtube* baru dan didiamkan selama tiga menit. *Microtube* disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. Hasil DNA yang telah terekstraksi disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Bakteri diidentifikasi dengan *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan sekuen 16S rDNA. Primer yang digunakan adalah 27f (5'GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') dan 1492r (5'CTACGGCTACCTTGTACGA3'). Komponen yang dibutuhkan untuk PCR dapat dilihat pada Tabel 2. Komponen tersebut diproses menurut kondisi program PCR seperti pada Tabel 3 (Setia & Suharjono, 2015).

Tabel 2. Komposisi PCR *mix*

Komposisi	Volume (μL)
ddH ₂ O	19
PCR <i>master mix</i>	25
Primer 27f (10 pmol)	2
Primer 1492r (10 pmol)	2
<i>Template</i> DNA (31,24 ng/ μL)	2

Tabel 3. Kondisi program PCR sampel

Reaksi	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Waktu (menit)	Jumlah Siklus
Pra denaturasi	94	5	1
Denaturasi	94	0,5	35
<i>Annealing</i>	55	0,5	35
Ekstensi	72	1,5	35
Post ekstensi	72	5	1

(Setia & Suharjono, 2015)

Amplikon dielektroforesis dengan gel agarosa 1,5 % menggunakan elektroforesis (50 volt, 60 menit) dan disekuensing di First Base, Malaysia. Hasil sekuensing dibandingkan dengan data di NCBI

menggunakan BLASTN kemudian dibuat pohon filogeni dengan MEGA6. Sekuen isolat bakteri dengan isolat-isolat acuan disejajarkan menggunakan ClustalW kemudian data disimpan dalam format MEGA. Data tersebut digunakan untuk membuat pohon filogeni menggunakan algoritma *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap* 1000. Isolat bakteri dengan isolat-isolat acuan dihitung jarak genetiknya menggunakan *pairwise distance* dengan model Tamura-Nei (Mitra & Roy, 2010; Sultan dkk., 2012; Setia & Suharjono, 2015).



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Faktor Lingkungan Tanah Rizosfer *Andrographis paniculata*

Faktor lingkungan tanah rizosfer tanaman *Andrographis paniculata* yang diukur adalah intensitas cahaya, suhu tanah, pH tanah, kelembaban tanah, dan bahan organik tanah. Nilai masing-masing faktor lingkungan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Parameter lingkungan tanah rizosfer *Andrographis paniculata*

Parameter	Nilai
Intensitas cahaya (klux)	2,26±1,76
Suhu tanah (°C)	22±1,1
pH tanah	6,96±0,15
Kelembaban tanah (%)	71,5±0,47
Bahan organik tanah (%)	7,3±4,04

Intensitas cahaya yang terukur adalah 2,26±1,76 klux, sedangkan suhu tanah sebesar 22±1,1 °C. Suhu merupakan faktor yang penting dalam regulasi aktivitas mikroorganisme. Laju pertumbuhan bakteri yang tumbuh di tanah dengan lingkungan dingin biasanya memiliki suhu optimum kurang dari 30 °C. Umumnya suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri adalah 25-30 °C (Pietikainen dkk., 2005). Suhu yang lebih dari suhu optimum mengurangi laju pertumbuhan bakteri bahkan menginduksi kematian bakteri. Suhu tinggi akan berpengaruh pada fluiditas membran sel akibat asam lemak pada fosfolipid menjadi lebih longgar sehingga lebih banyak protein dan molekul lain yang dapat masuk dengan mudah melalui membran. Suhu yang terlalu tinggi juga dapat memecah atau mendenaturasi protein. Suhu rendah menyebabkan asam lemak menjadi lebih kaku dan mengurangi fluiditas serta permeabilitas membran (Chandler, 2018). Suhu yang

lebih rendah tidak membunuh bakteri, melainkan hanya memperlambat pertumbuhannya (Fernandez-Calvino & Baath, 2010).

Nilai pH tanah adalah $6,96 \pm 0,15$. Menurut Cho dkk. (2016) kisaran pH optimum untuk pertumbuhan bakteri tanah adalah 6-8. Nilai pH tanah yang diperoleh berada pada kisaran nilai optimum. Derajat keasaman atau pH memberikan pengaruh pada aktivitas komunitas mikroorganisme dan proses biogeokimia. Derajat keasaman memengaruhi bentuk kimia, konsentrasi dan ketersediaan substrat dan dapat memengaruhi aktivitas dan pertumbuhan sel mikroorganisme. Selain itu, pH tanah juga penentu diversitas dan struktur komunitas bakteri (Nicol dkk., 2008). Nilai pH tanah dapat memengaruhi solubilitas kimia dengan cara memengaruhi derajat ionisasi (Cho dkk., 2016). Hampir tidak ada bakteri yang dapat tumbuh pada tanah dengan pH yang sangat rendah. Nilai pH yang lebih tinggi dari nilai optimum dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri hingga jumlah maksimum, tetapi nilai pH yang terlalu tinggi juga dapat menurunkan jumlah bakteri (Fernandez-Calvino & Baath, 2010).

Kelembaban tanah rizosfer tanaman tersebut adalah $71,5 \pm 0,47$ %. Kandungan air di dalam tanah penting dalam meregulasi difusi oksigen dan aktivitas maksimum bakteri aerob adalah pada tingkat kelembaban antara 50-70 %. Kandungan air di dalam tanah memengaruhi fisiologis mikroorganisme dan juga tanaman. Kelebihan air di dalam lingkungan tanah akibat banjir atau hujan dapat mengancam pertumbuhan bakteri aerob (Borowik & Wyszowska, 2016).

Bahan organik tanah yang terukur adalah $7,3 \pm 4,04$ %. Bahan organik tanah dapat dikonversi sebagai total karbon, baik karbon organik maupun anorganik. Total karbon dari bahan organik tanah *A. paniculata* adalah 4,24 %. Total karbon sebesar 4-10 % termasuk ke dalam kategori sedang (Stres dkk., 2008; Broadbent, 2011). Bahan organik merupakan campuran dari tanaman dan kotoran hewan yang terdekomposisi oleh populasi di dalam tanah dan secara garis besar tersusun dari karbon, oksigen, hidrogen, nitrogen, sulfur, dan fosfor. Bahan organik berperan sebagai sumber nutrisi tanaman dan meningkatkan kapasitas kelembaban dan nutrisi pada tanah. Penguraian bahan organik tanah dilakukan oleh mikroorganisme yang melepas bentuk anorganik nutrien, seperti nitrogen (N), fosfor (P), dan

sulfur (S) (Broadbent, 2011). Pertumbuhan bakteri yang cepat karena kondisi kelembaban tanah yang optimum juga dapat menyebabkan bakteri mudah mendegradasi bahan organik di dalam tanah (Borowik & Wyszowska, 2016).

Densitas sel *rhizobacteria A. paniculata* sebanyak $1,68 \times 10^6$ CFU/g tanah. Nilai tersebut tergolong lebih sedikit dari densitas sel bakteri tanah pada umumnya. Hal ini disebabkan karena dua parameter lingkungan yang kurang mendukung pertumbuhan bakteri secara optimal, yaitu suhu dan kelembaban tanah, sehingga pertumbuhan bakteri tanah kurang optimal. Populasi bakteri di tanah rizosfer memiliki rentang 10^8 - 10^9 per gram tanah. Populasi bakteri tersebut mampu menutupi total area akar sebesar 4-10 % (Geetanjali & Jain, 2016).

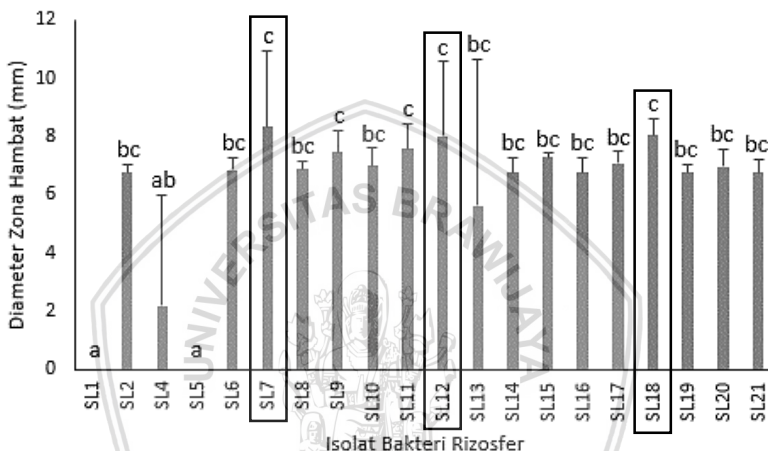
4.2 Potensi *Rhizobacteria Andrographis paniculata* sebagai Antibakteri *Salmonella Typhi* ATCC 58105535

Bakteri yang diisolasi dari rizosfer tanaman *Andrographis paniculata* berjumlah 21 isolat, tetapi satu isolat tidak dapat tumbuh dengan baik saat pengulturan ulang sehingga hanya 20 isolat bakteri yang diuji potensi hambatnya. Pemilihan isolat tersebut didasarkan pada perbedaan morfologi bakteri. Bentuk dan Gram bakteri yang terisolasi adalah 13 isolat berbentuk batang Gram positif, empat isolat berbentuk batang Gram negatif, satu isolat berbentuk kokus Gram negatif, dan dua isolat berbentuk kokus Gram positif. Semua bakteri yang diisolasi diuji potensi hambatnya terhadap *S. Typhi* ATCC 58105535 dan diameter zona hambat disajikan pada Gambar 10.

Delapan belas isolat *rhizobacteria A. paniculata* mampu menghambat pertumbuhan *S. Typhi* ATCC 58105535. Ada lima isolat yang memiliki daya hambat paling tinggi dengan notasi c. Namun, hanya isolat yang memiliki diameter zona hambat lebih dari 8 mm yang diuji lebih lanjut, yaitu SL7, SL12, dan SL18. Diameter zona hambat ketiga isolat sebesar $8,31 \pm 2,6$; $8,01 \pm 2,54$ dan $8,05 \pm 0,58$ mm. Isolat SL1 dan SL5 tidak menunjukkan adanya zona hambat yang berarti kedua isolat tidak mampu menghambat pertumbuhan *S. Typhi*.

Rizosfer adalah bagian tanah di sekitar akar tanaman yang menjadi tempat hidup berbagai populasi mikroorganisme, termasuk bakteri, fungi, actinomycetes, dan alga. Mikroorganisme tersebut dipengaruhi

oleh senyawa kimia yang dieksresikan dari akar tanaman. *Rhizobacteria* dari tanah Hutan Nanga Merit diuji kemampuan hambatnya terhadap *S. Typhi* dan menunjukkan bahwa *rhizobacteria* tersebut mampu memiliki aktivitas yang kuat terhadap *S. Typhi*. Bakteri tersebut menghambat pertumbuhan *S. Typhi* dengan diameter zona hambat sebesar 6-10 mm dan memiliki MIC sebesar 25 mg/mL (Lihan dkk., 2014).



Gambar 10. Diameter zona hambat *rhizobacteria* *A. paniculata* terhadap *Salmonella* Typhi ATCC 58105535

4.3 Potensi Metabolit *Rhizobacteria Andrographis paniculata* sebagai Antibakteri *Salmonella* Typhi ATCC 58105535

Kurva pertumbuhan dibuat untuk mengetahui fase stasioner dari isolat bakteri unggul yang diperoleh dari hasil *screening* awal dikarenakan senyawa antibakteri merupakan metabolit sekunder dari bakteri yang diproduksi pada fase tersebut. Hasil kurva pertumbuhan menunjukkan adanya fase lag, log, dan stasioner pada isolat SL18, sedangkan pada isolat SL7 hanya terdapat fase log dan stasioner saja. Isolat SL18 mengalami fase lag hingga jam ke-4 yang juga merupakan awal dari fase log. Fase stasioner dimulai dari jam ke-18 hingga jam ke-24. Isolat SL7 mengalami fase log hingga jam ke-18 tanpa perlu

beradaptasi dengan media tumbuhnya. Isolat tersebut mengalami fase stasioner dari jam ke-18 hingga ke-24. Jumlah generasi dan waktu generasi SL7 secara berurutan adalah 8 dan 1,9 jam. Jumlah generasi dan waktu generasi SL18 secara berurutan adalah 9 dan 1,48 jam.

Tiga isolat bakteri dengan diameter tertinggi dibuat kurva pertumbuhannya, tetapi terdapat kendala saat pengulturan ulang SL12 dan nilai densitas optiknya sangat rendah sehingga kesulitan dalam pembuatan kurva. Dua isolat bakteri unggul lainnya yang telah diketahui kurva pertumbuhannya dikulturkan ulang hingga mencapai fase stasioner yaitu jam ke-18 sampai jam ke-24 untuk isolat SL7 dan SL18. *Cell free supernatant* dari kedua isolat diuji aktivitas antibakterinya terhadap *S. Typhi* karena supernatan tersebut mengandung metabolit sekunder dari isolat bakteri. Uji dilakukan dengan menggunakan supernatan yang tidak diatur pH dan supernatan dengan pH netral. Nilai pH pada supernatan isolat SL7 dan SL18 berdasarkan waktu inkubasi selama fase stasioner dapat dilihat pada Tabel 5.

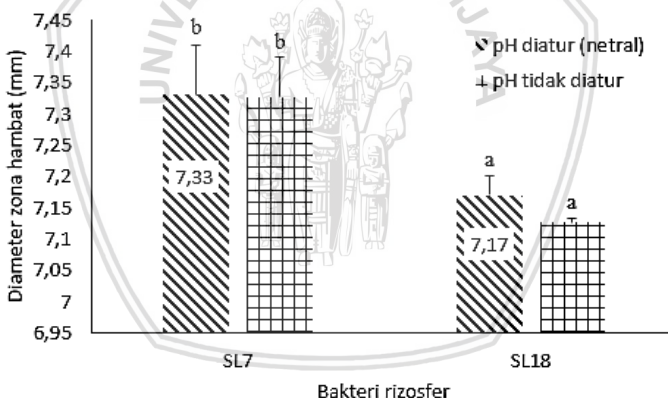
Tabel 5. Nilai pH *cell free supernatant* isolat SL7 dan SL18 yang tidak diatur

Isolat	Nilai pH		
	Waktu inkubasi (jam)		
	18	21	24
SL7	7,53	7,31	8,05
SL18	8,00	8,08	8,13

Hasil pada Gambar 11 menunjukkan bahwa isolat SL7 lebih unggul daripada isolat SL18. Perlakuan dengan pH tidak diatur dan pH netral tidak terdapat perbedaan yang signifikan dalam uji ini. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi pH diatur netral dan tidak diatur pada supernatan tidak memengaruhi kemampuan hambatnya terhadap pertumbuhan *S. Typhi*.

Isolat SL7 memiliki diameter zona hambat sebesar $7,33 \pm 0,08$ mm dan isolat SL18 sebesar $7,17 \pm 0,3$ mm. Waktu inkubasi untuk mendapatkan kemampuan hambat metabolit SL7 tertinggi adalah 18

jam, sedangkan SL18 adalah 24 jam. Penelitian lain oleh Moshafi dkk. (2011) mengenai aktivitas antimikroba oleh bakteri yang diisolasi dari tanah di beberapa taman di Kerman, Iran menunjukkan bahwa supernatan bebas sel bakteri yang digunakan mampu menghambat pertumbuhan *S. Typhi* dengan diameter zona hambat sebesar 14 mm. Selain dapat menghambat *S. Typhi*, supernatan isolat bakteri tanah dari taman Kerman juga mampu menghambat *Klebsiella pneumoniae* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan diameter masing-masing 16 mm. Penelitian oleh Mashoria dkk. (2014) menunjukkan bahwa supernatan bebas sel isolat bakteri tanah dari area Bhopal, India memiliki kemampuan hambat terhadap *S. Typhi* sebesar $12,05 \pm 0,07$ mm. Perbedaan ukuran diameter zona hambat yang diperoleh pada penelitian ini dan penelitian sebelumnya dapat disebabkan oleh perbedaan kemampuan metabolit yang diproduksi oleh *rhizobacteria* dalam menghambat bakteri patogen.



Gambar 11. Perbandingan diameter zona hambat CFS *rhizobacteria* dengan pH diatur (netral) dan tidak diatur terhadap pertumbuhan *S. Typhi* ATCC 58105535

Bakteri patogen memiliki kemampuan genetik untuk menjadi resisten terhadap obat yang digunakan. Salah satu cara yang dapat digunakan sebagai solusi terhadap resistensi antibiotik adalah dengan menggunakan senyawa baru. Senyawa tersebut tidak hanya dapat

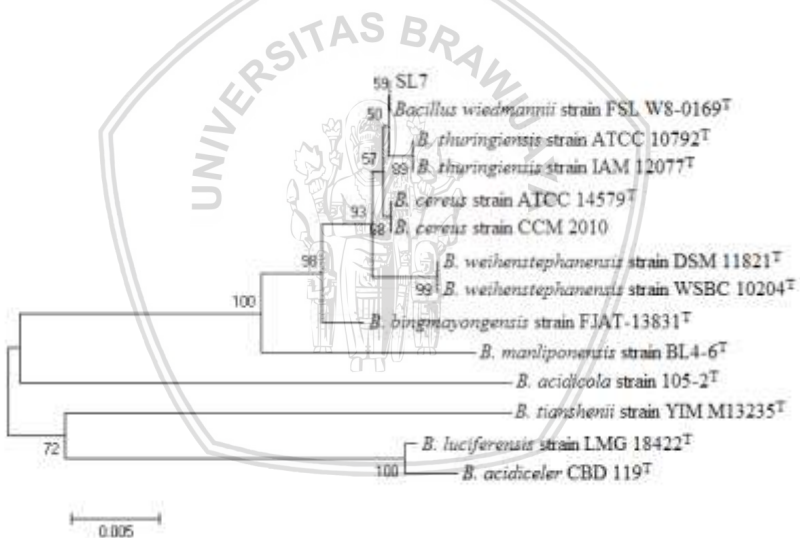
diperoleh dari tanaman yang umum digunakan sebagai obat, tetapi juga dari bakteri tanah rizosfer tanaman tersebut. Bakteri tanah rizosfer mampu menghasilkan senyawa dengan sifat fitokimia yang sama seperti yang diproduksi oleh tanamannya (Egamberdieva dkk., 2015). Senyawa fitokimia yang berasal dari tanaman obat memiliki aktivitas antimikroba. Masing-masing bagian tanaman *Andrographis paniculata* mampu memproduksi senyawa berbeda. Daunnya mengandung senyawa steroid, alkaloid, fenol, saponin, tannin, triterpenoid, glikosida, dan *anthracene glycosides*. Batangnya mengandung steroid, fenol, saponin, tannin, flavonoid, dan *anthracene glycosides*. Ekstrak dari masing-masing bagian tanaman diujikan pada *Salmonella Typhi* dan menunjukkan adanya kemampuan menghambat patogen (Anand dkk., 2011).

Tanaman *A. paniculata* memiliki efek farmakologis yang luas. Komponen utama *A. paniculata* yang berperan sebagai obat adalah andrographolide yang termasuk ke dalam kelompok diterpenoid. Selain senyawa tersebut, 14-deoxy-11, 12-dihydroandrographolide (andrographolide D), homoandrographolide, andrographosterin dan stigasterol merupakan senyawa aktif yang diproduksi oleh *A. paniculata*. Ekstrak kloroform dari *A. paniculata* menunjukkan adanya zona hambat terhadap bakteri *S. Typhi*. Asam fenol dan fenolat juga berperan sebagai racun bagi mikroorganisme. Mekanisme yang dilakukan adalah penghambatan enzim oleh senyawa teroksidasi (Roy dkk., 2010).

Senyawa diterpenoid dapat dibagi menjadi diterpen linier, bicyclic, tricyclic, tetracyclic, pentacyclic, dan macrocyclic. Senyawa-senyawa tersebut ditemukan di alam dalam bentuk *polyoxygenated* dengan gugus keto dan hidroksil. Terpenoid menunjukkan spektrum luas dalam menghambat berbagai bakteri patogen Gram positif dan negatif. Senyawa tersebut dapat menembus dinding sel dan membran sel dengan mudah karena bersifat lipofilik. Terpenoid juga mampu mengganggu integritas dan potensial membran, mendenaturasi protein sitoplasma, dan menginaktivasi enzim selular yang menyebabkan kematian sel bakteri (Badal & Delgoda, 2017).

4.4 *Rhizobacteria Andrographis paniculata* Penghambat *S. Typhi* ATCC 58105535

Template DNA SL7 untuk proses PCR memiliki konsentrasi 31,24 ng/μL. Identifikasi bakteri hanya dilakukan pada isolat SL7 karena memiliki daya hambat yang paling tinggi dari antara kedua isolat unggul. Sekuen dari isolat SL7 memiliki panjang basa 1461 bp kemudian dibandingkan kemiripan basanya dengan sekuen bakteri yang tersimpan di *database* NCBI. Hasil *BLAST* isolat bakteri dengan isolat-isolat acuan dibuat pohon filogeninya menggunakan metode *Neighbor-Joining*. Pohon filogeni yang diperoleh menunjukkan bahwa sekuen isolat SL7 memiliki kemiripan dengan *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169 sebesar 100 % (Gambar 12). Jarak genetik isolat SL7 dengan *B. wiedmannii* FSL W8-0169 adalah 0.



Gambar 12. Pohon filogeni isolat SL7 bersama isolat-isolat acuan berdasarkan homologi sekuen 16S rDNA dengan algoritma *Neighbor-Joining*

Menurut Drancourt dkk. (2000) isolat yang diidentifikasi menggunakan sekuen 16S rDNA dapat teridentifikasi hingga mencapai tingkat spesies apabila similaritasnya dengan sekuen dari

strain acuan sebesar $\geq 99\%$ dan mencapai tingkat genus apabila similaritasnya sebesar $\geq 97\%$. Tingkat similaritas yang bernilai lebih rendah dari 97% terhadap strain acuan dianggap tidak valid.

Bacillus wiedmannii FSL W8-0169 merupakan spesies bakteri yang tergabung dalam kelompok *Bacillus cereus* atau biasa disebut dengan *Bacillus cereus sensu lato*. *Bacillus cereus sensu lato* merupakan kelompok yang terdiri dari beberapa spesies *Bacillus* yang memiliki hubungan kekerabatan dekat. Spesies-spesies tersebut memiliki nilai kemiripan sekuen sebesar 99% jika dilihat berdasarkan 16S rDNA. Kelompok ini terdiri dari spesies patogen dan non-patogen. Kelompok *Bacillus cereus* merupakan bakteri anaerob fakultatif yang mampu membentuk spora. *Bacillus wiedmannii* adalah bakteri psikrotoleran yang memproduksi haemolysin BL dan non-haemolytic enterotoxin serta sitotoksik pada sel model HeLa (Miller dkk., 2016).

Bacillus cereus sensu lato memproduksi antibiotik peptida dan lipopeptida. Kelompok antibiotik tersebut menunjukkan efektivitas yang tinggi dalam menghambat bakteri yang resisten terhadap antibiotik. Agen antimikroba diklasifikasikan menjadi dua tipe berdasarkan mekanisme biosintesisnya, yaitu peptida yang tersintesis di dalam ribosom dan di luar ribosom. Peptida yang tersintesis di dalam ribosom umumnya memiliki aktivitas antimikroba dengan spektrum sempit. Peptida yang tersintesis di luar ribosom memiliki spektrum yang lebih luas dalam menghambat bakteri atau fungi. Beberapa antibiotik lipopeptida yang dihasilkan oleh *Bacillus sensu lato* biasa digunakan untuk mengobati penyakit infeksius (Dinh dkk., 2014).

Contoh antibiotik peptida yang disintesis di luar ribosom adalah gramicidin, tyrocidin, baciracin, surfactin, iturins, dan fengycins. Antibiotik tersebut disintesis melalui mekanisme yang melibatkan seleksi dan kondensasi residu asam amino oleh *multienzyme thiotemplates*. Mekanisme sintesis ini dimediasi oleh *nonribosomal peptide synthetase*. Enzim-enzim multi-subunit berukuran besar dengan rentang 100 hingga lebih dari 1600 kDa berperan dalam sintesis peptida antibiotik (Sumi dkk., 2015).

Peptida-peptida yang disintesis di luar ribosom diinisiasi oleh lebih dari 300 prekursor. Peptida-peptida ini dapat berbentuk linier atau siklik, ada kemungkinan memiliki struktur siklik bercabang dengan

gugus hidroksil, asam amino-L, atau asam amino-D. Peptida ini dapat termodifikasi lebih kompleks oleh adanya pembentukan metilasi-N, asilasi, glikosilasi, atau cincin heterosiklik (Sumi dkk., 2015).

Antibiotik peptida yang disintesis di ribosom mengandung 12-50 residu asam amino. Bacteriocin merupakan antimikroba peptida (AMP) yang disintesis di dalam ribosom dan aktif menghambat bakteri. Mekanisme kerja antibiotik peptida meliputi pembentukan *channel* yang dapat dilalui oleh ion atau mengganggu membran sitoplasma bakteri. Mekanisme ini diawali dengan terjadinya *binding* pada membran bakteri, menyatu dengan membran, dan membentuk *channel*. Terbentuknya *channel* menyebabkan terjadinya kebocoran sel-sel internal dan berakhir pada kematian sel. Antibiotik peptida harus melewati dinding luar sel bakteri Gram negatif yang bermuatan negatif (mengandung lipopolisakarida) atau dinding luar sel bakteri Gram positif yang mengandung asam polisakarida (Sumi dkk., 2015).

Lipopeptida berikatan dengan permukaan bilayer bakteri dan mengubah ikatan lipid bakteri pada asam lemak yang bermuatan negatif sehingga dapat mengubah struktur lipid bilayer. Asam lemak yang terkandung dalam lipopeptida juga berperan penting dalam aktivitas antimikroba (Sumi dkk., 2015). Lipopeptida terdiri dari peptida linier atau siklik dan berikatan secara kovalen dengan *fatty acid moiety*. Lipopeptida menunjukkan potensi yang baik dalam menghambat *multi-drug resistant pathogens*. Kombinasi antara asam lemak dengan kationik AMP dapat mengubah bentuk struktur sekunder AMP ketika berikatan dengan membran bakteri target (Li, 2017).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Daya hambat metabolit *rhizobacteria* SL7 menunjukkan diameter zona hambat tertinggi, yaitu $7,33 \pm 0,08$ mm, terhadap *Salmonella* Typhi ATCC 58105535.
2. Isolat SL7 memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169 dengan nilai similaritas 100 %.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan *freeze drying* supernatan bebas sel bakteri sehingga dapat diatur konsentrasi metabolit sampel uji dan dapat diukur *minimum inhibitory concentration* (MIC). Identifikasi senyawa dari metabolit bakteri yang berkemampuan menghambat pertumbuhan *S. Typhi* juga diperlukan untuk mengetahui senyawa aktif yang bekerja sehingga dapat diproduksi dalam jumlah banyak untuk digunakan sebagai obat alternatif terhadap penyakit tifus dan mencegah terjadinya *outbreak* penyakit tersebut. Untuk mengecek keamanan penggunaan antibakteri ini, lebih baik apabila dilakukan uji patogenesis dan uji kemampuan hambatnya terhadap bakteri komensal di dalam tubuh manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Abiala, M. A., A. C. Odebode, S. F. Hsu & C. B. Blackwood. 2015. Phytobeneficial properties of bacteria isolated from the rhizosphere of maize in southwestern nigerian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(14):4736-4743.
- Ali, K. & S. Sultana. 2016. Antimicrobial sensitivity patterns of *Salmonella* Typhi in children. *BJMS.* 15(3):416-418.
- Anand, M., P. Prabakaran & V. Pradeepa. 2011. A study on the phytochemicals characterization and antimicrobial potential of *Andrographis paniculata*. *J. Pharm. Res.* 4(2):530-531.
- Awad, H. M., Kamal, Y. I. El-Shahed, R. Aziz, M. R. Sarmidi, Hesham & A. El-Enshasy. 2012. Antibiotics as microbial secondary metabolites: Production and Application. *J. Teknol.* 59(1):101-111.
- Badal, S. & R. Delgoda. 2017. **Pharmacognosy: Fundamentals, applications and strategies**. Elsevier Inc. New York.
- Banerjee, M., D. Parai, S. Chattopadhyay & S. K. Mukherjee. 2017. Andrographolide: Antibacterial activity against common bacteria of human health concern and possible mechanism of action. *Folia Microbiol.* 62(3):237-244.
- Berg, G. & M. A. Alavi. 2013. **Molecular microbial ecology of the rhizosphere**. Volume 2. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Bhutta, Z. A. 2006. Typhoid fever: Current concepts. *Infect. Dis. Clin. Pract.* 14:266-272.
- Borowik, A. & J. Wyszowska. 2016. Soil moisture as a factor affecting the microbiological and biochemical activity of soil. *Plant Soil Environ.* 6:250-255.
- Broadbent, F. E. 2011. Soil organic matter. <http://www.boprc.govt.nz>. Diakses pada tanggal 25 Juni 2018.
- Carter, M. R. & E. G. Gregorich. 2007. **Soil sampling and methods of analysis**. Second Edition. CRC Press. Boca Raton.
- Chandler, S. 2018. The effect of temperature on cell membranes. <http://sciencing.com>. Diakses pada tanggal 15 Agustus 2018.
- Cho S., M. Kim & Y. Lee. 2016. Effect of pH on soil bacteria diversity. *J. Ecol. Environ.* 40:10.

- DeAngelis, K. M. 2007. Measurement of soil moisture content by gravimetric method. <http://nature.berkeley.edu>. Diakses tanggal 15 Agustus 2018.
- Dinh, T. T. V., N. H. L. Bui, V. Hop, M. P. Doan & T. T. Trinh. 2014. Identification of antibiotic-producing *Bacillus sensu lato* isolated from national parks of Hoang Lien and Phu Quoc in Vietnam. *J. Viet. Env.* 6(1):77-83.
- Dougan, G. & S. Baker. 2014. *Salmonella enterica* serovar typhi and the pathogenesis of typhoid fever. *Annu. Rev. Microbiol.* 68:317-336.
- Doughari, J. H. & N. B. Okafor. 2008. Antibacterial activity of *Senna siamae* leaf extracts on *Salmonella Typhi*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2:42-46.
- Drancourt, M., C. Bollet & D. Raoult. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38(10):3623-3630.
- Egamberdieva, D., S. Shrivastava & A. Varma. 2015. **Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants.** Springer International Publishing. Cham.
- Fernandez-Calvino, D. & E. Baath. 2010. Growth response of the bacterial community to pH in soil differing in pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73:149-156.
- Geetanjali & P. Jain. 2016. Antibiotic production by rhizospheric soil microflora – A review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 7(11):4304-4314.
- Hall, B. G., H. Acar, A. Nandipati & M. Barlow. 2013. Growth rates made easy. *Mol. Biol. Evol.* 31(1):232-238.
- Hossain, M. S., Z. Urbi, A. Sule & K. M. H. Rahman. 2014. *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. Ex Nees: A review of ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology. *Sci. World J.* 2014:1-28.
- Jahangirian, H., M. D. J. Haron, M. H. S. Ismail, R. Rafiee-Moghaddam, L. Afsah-Hejri, Y. Abdollahi, M. Rezayi & N. Vafaei. 2013. Well diffusion method for evaluation of antibacterial activity of copper phenyl fatty hydroxamate synthesized from canola and palm kernel oils. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* 8(3):1263-1270.

- Jayakumar, T., C. Hsieh, J. Lee & J. Sheu. 2013. Experimental and clinical pharmacology of *Andrographis paniculata* and its major bioactive phytoconstituent andrographolide. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013:1-16.
- Kaufman, G. 2011. Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance. *Nurs. Stand.* 25(42):49-55.
- Li, W. 2017. Antimicrobial peptides: Alternatives to combat bacterial infections. <http://www.eurpepsoc.com>. Diakses tanggal 14 Agustus 2018.
- Lihan, S., C. S. Lin, I. Ahmad, F. M. Sinang, N. K. Hua & A. A. Sallehin. 2014. Antimicrobial producing microbes isolated from soil samples collected from Nanga Merit Forest in Sarawak, Malaysian Borneo. *Euro. J. Exp. Bio.* 4(1):494-501.
- Mahon, C. R., D. C. Lehman & G. Manuselis. 2015. **Textbook of diagnostic microbiology**. Fifth Edition. Saunders. Missouri.
- Mashoria, A., H. S. Lovewanshi & B. S. Rajawat. 2014. Isolation of antimicrobial producing bacteria from soil samples collected from Bhopal region of Madhya Pradesh, India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3(12):563-569.
- Mendes, R., P. Garbeva & J. M. Raaijmakers. 2013. The rhizosphere microbiome: Significance of plant-beneficial, plant-pathogenic and human-pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 37(5):634-663.
- Miller, R. A., S. M. Beno, D. J. Kent, L. M. Carroll, N. H. Martin, K. J. Boor & J. Kovac. 2016. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66:4744-4753.
- Mitra, S. & P. Roy. 2010. Molecular identification by 16S rDNA sequence of a novel bacterium capable of degrading trichloroethylene. *J. Biol. Sci.* 10(7):637-642.
- Moore, D. 2017. Antibiotic classification & mechanism. <http://www.orthobullets.com>. Diakses pada tanggal 6 September 2017.
- Moshafi, M. H., H. Forootanfar, A. Ameri, M. Shakibaie, G. Dehghan-Noudeh & M. Razavi. 2011. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. strain FAS 1 isolated from soil. *Pak. J. Pharm. Sci.* 24(3):269-275.

- Muhammad, S. A., Z. U. Shah, F. Ali & Inam-ul-Haq. 2011. Activity of commercially available herbal drugs against *Salmonella* Typhi. *Indian J. Sci. Technol.* 4(5):477-480.
- Nicol, G. W., S. Leininger, C. Schleper & J. I. Prosser. 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmen. Microbiol.* 10(11):2966-2978.
- Pang, T. & G. E. Guindon. 2004. Globalization and risks to health. *EMBO Rep.* 5(1):S11-S16.
- Parry, C. M., T. T. Hien, G. Dougan, N. J. White & J. J. Farrar. 2002. Typhoid fever. *N. Engl. J. Med.* 347(22):1770-1782.
- Paul, U. K. & A. Bandyopadhyay. 2017. Typhoid fever: A review. *Int. J. Adv. Med.* 4(2):300-306.
- Pietikainen, J., M. Petterson & E. Baath. 2005. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52:49-58.
- Redgrave, L. S., S. B. Sutton, M. A. Webber & L. J. Piddock. 2014. Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 22(8):438-445.
- Robertson, S. 2011. Direct estimation of organic matter by loss on ignition: Methods. <http://www.sfu.ca>. Diakses pada tanggal 15 Agustus 2018.
- Roy, S., K. Rao, C. Bhuvaneswari, A. Giri & L. N. Mangamoori. 2010. Phytochemical analysis of *Andrographis paniculata* extract and its antimicrobial activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26:85-91.
- Sattar, A. F. M. A., M. A. Yusuf, M. B. Islam & W. A. Jahan. 2013. Different diagnostic procedure of typhoid fever: A review update. *J. Curr. Adv. Med. Res.* 1(2):35-41.
- Setia, I. M. & Suharjono. 2015. Chitinolytic assay and identification of bacteria isolated from shrimp waste based on 16S rDNA sequences. *Adv. Microbiol.* 5:541-548.
- Sinha, N. 2016. Antibacterial activity of *Andrographis paniculata* Nees against selective human pathogens. *IJRASET.* 4(6):274-278.
- Stres, B., T. Danevcic, L. Pal, M. M. Fuka, L. Resman, S. Leskovec, J. Hacin, D. Stopar, I. Mahne & I. Mandic-Mulec. 2008.

- Influence of temperature and soil water content on bacterial, archaeal and denitrifying microbial communities in drained fen grassland soil microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66:110-122.
- Sultan, N. S., R. Sinha, M. Nitin, Khalkho, B. S. Raipat & M. P. Sinha. 2012. 16S rDNA based identification of bacteria in the organophosphates treated agricultural soil. *IJASER*. 1(3):212-223.
- Sumi, C. D., B. W. Yang, I. Yeo & Y. T. Hahm. 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. *Can. J. Microbiol.* 61:93-103.
- Tribun Jabar. 2015. Banyak kasus tifus, biofarma kembangkan vaksin tifoid. <http://jabar.tribunnews.com>. Diakses pada 30 Agustus 2017.
- Ugboko, H. & N. De. 2014. Mechanism of antibiotic resistance in *Salmonella* Typhi. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3(12):461-476.
- Wain, J., R. S. Hendriksen, M. L. Mikoleit, K. H. Keddy & R. L. Ochiai. 2014. Typhoid fever. *Lancet*. 385(9973):1136-1145.
- World Health Organization. 2003. **Background document: The diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever**. World Health Organization. Jenewa.
- World Health Organization. 2015. Typhoid fever. <http://www.who.int>. Diakses pada 30 Agustus 2017.
- Zaki, S. A. & S. Karande. 2011. Multidrug-resistance typhoid fever: A review. *J. Infect. Dev. Ctries.* 5(5):324-337.
- Zorgani, A. & H. Ziglam. 2014. Typhoid fever: Misuse of Widal test in Libya. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8(6):680-687.